

ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ РОСЛИН

УДК 581.1

УЧАСТИЕ ЦИТОЗОЛЬНЫХ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА HSP70 И HSP90 В АДАПТАЦИИ ПРОРОСТКОВ *ARABIDOPSIS THALIANA* К ВОДНОМУ ДЕФИЦИТУ

© 2018 г. Л. Е. Козеко

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)

Arabidopsis thaliana имеет 9 генов, кодирующих цитозольные белки теплового шока HSP70, и 4 гена цитозольных HSP90. Данная работа посвящена изучению функционирования отдельных конститутивных и индуцибельных представителей этих семейств при адаптации проростков к засухе. Для имитации засухи использовали модель прогрессирующего водного дефицита в ростовой среде в стерильных условиях. Анализ генной экспрессии методом ОТ-ПЦР показал умеренную активацию конститутивных *AtHSP70-14* и *AtHSP90* при снижении содержания воды в среде, а также индукцию *AtHSP70-5* и *AtHSP90-1* при достижении определенного уровня водного дефицита. Кроме того, сравнение ростовой активности у проростков дикого типа и нокаут-мутантов *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5* и *Athsp70-14* показало, что нарушение экспрессии соответствующих HSP приводит к усилению угнетения роста корня в условиях развивающейся засухи. В целом, ростовая кинетика коррелировала с изменениями в генной экспрессии. Следует также отметить замедленный рост корня у проростков *Athsp90-4* и особенно у *Athsp70-5* при нормальных условиях. Полученные результаты показывают, что данные гены HSP умеренно активируются при развитии водного дефицита и играют определенную роль в поддержании ростовой активности.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, засуха, HSP70, HSP90, экспрессия генов, мутанты

Изучение молекулярных основ засухоустойчивости является одним из актуальных направлений биологии растений, которое приобретает особое значение в связи с аридизацией климата (Кордюм и др., 2003). Водный дефицит, возникающий в организмах при засухе, приводит к уменьшению количества свободной и связанной воды в клетках, нарушению гидратных оболочек белков, их денатурации и потере ферментативной активности (Billi, Potts, 2002; Gray, 2002). В связи с этим одним из важных компонентов защиты протеома при обезвоживании являются белки теплового шока (heat shock protein, HSP) (Shinozaki, Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Jacob et al., 2017). Функционируя как шапероны, они способны противодействовать агрегации денатурированных протеи-

нов и восстанавливать их нативную структуру при регидратации, либо направлять на протеолиз (Picard, 2002; Mayer, Bukau, 2005). Способность шаперонов противодействовать дезактивации ферментов в денатурирующих условиях показана *in vitro* (Liu et al., 2017).

О значении HSP для устойчивости растительных клеток к обезвоживанию может свидетельствовать их накопление в зародыше семени и пыльце в период созревания (Sung et al., 2001; Prasinos et al., 2005). При этом отмечается дифференциальное участие отдельных HSP в этих процессах. Кроме того, показано, что сверхэкспрессия HSP повышает устойчивость растений к различным неблагоприятным факторам, в том числе и к водному дефициту, а также влияет на рост и развитие (Sung, Guy, 2003; Sato, Yokoya, 2008; Cazalé et al., 2009).

Как известно, адаптивные процессы при длительном действии дефицита воды, в боль-

шей степени соответствующем природным флуктуациям влажности, кардинально отличаются от реакции растений на кратковременное обезвоживание (Бобровницкий, 2013). Поэтому данная работа сфокусирована на участии HSP, в частности HSP70 и HSP90, в адаптации растений к водному дефициту, развивающемуся во времени.

В литературе данные об этом достаточно фрагментарны. Тем не менее, проведенные исследования показывают значимость шаперонов для адаптации различных видов растений к засухе. Так, активация синтеза HSP70, локализованных в цитозоле и эндоплазматическом ретикулуме, определялась у *Physcomitrella patens* при глубоком обезвоживании (Wang et al., 2009). Повышенное содержание конститутивного и индуцибельного HSP70 детектировалось в листьях злака *Synodon dactylon* после двухнедельного высыхания почвы (Ye et al., 2015). Последовательная активация синтеза конститутивной и индуцибельной изоформ HSP70 выявлялась у высокопластичных видов *Malva sylvestris* и *M. pulchella* в ходе адаптации к прогрессирующей засухе (Козеко, Рахметов, 2016). У *Nicotiana tabacum* два гена HSP70, индуцируемые при тепловом шоке, по-разному реагировали на засуху: *NtHSP70-1* отвечал на высыхание субстрата значительной активацией транскрипции, в отличие от *NtHSP70-3*, уровень экспрессии которого не изменялся (Cho, Hong, 2004). Накопление HSP70 в засушливых условиях выявлялось также у высоко пластичных воздушно-водных видов *Alternanthera philoxeroides* (Jia et al., 2015) и *Sium latifolium* (собственные неопубликованные данные). Дифференциальная экспрессия трех HSP70 и трех HSP90 при обработке ПЭГ показана у риса (Zou et al., 2009). Однако, учитывая многочисленность семейств HSP70 и HSP90 у растений, сведения об особенностях функционирования отдельных изоформ можно считать весьма ограниченными.

Семейство HSP70 у модельного вида *Arabidopsis thaliana* содержит шесть цитозольных изоформ подсемейства DnaK, из которых два индуцируются высокой температурой, и три цитозольных изоформы подсемейства HSP110/SSE (Lin et al., 2001). Семейство HSP90 включает четыре цитозольных члена (Krishna, Gloor, 2001). Синтез AtHSP90-2, AtHSP90-3 и AtHSP90-4 поддерживается в клетках на высоком уровне при нормальных условиях и может усиливаться при стрессе, тогда как AtHSP90-1 является индуцибельным (Miloni, Hatzopoulos, 1997; Naralampidis et al., 2002). Анализ тран-

скриптов через 6-7 дней после прекращения полива растений *A. thaliana* выявил значительную (в 4 раза и более) активацию экспрессии ряда HSP, в первую очередь AtHSP70-4 – главного индуцибельного HSP70 при тепловом шоке (Rizhsky et al., 2004). Вместе с тем, о характере экспрессии других индуцибельных генов AtHSP70-5 и AtHSP90-1 не сообщается. Вопрос об их участии в адаптации к засушливым условиям, также как и об участии конститутивных HSP, не показавших значительной активации, остается открытым. Данная работа посвящена изучению роли таких HSP в адаптации проростков *A. thaliana* к постепенно нарастающему водному дефициту. В работе сравниваются индуцибельные AtHSP70-5 (Hsp70b, подсемейство DnaK) и AtHSP90-1 (Hsp81.1) и конститутивные AtHSP70-14 (Hsp91, подсемейство HSP110/SSE) и AtHSP90-4 (Hsp81.4). Представлены данные анализа кинетики экспрессии генов у дикого типа и ростовой активности проростков дикого типа и нокаут-мутантов при развитии водного дефицита. При этом экспрессию AtHSP90-4 определяли в сумме с двумя другими конститутивными HSP90 вследствие их высокой гомологии и сходного характера экспрессии (Miloni, Hatzopoulos, 1997; Yamada et al., 2007).

МЕТОДИКА

Для экспериментов использовали *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. дикого типа (Col-0) и созданные на его основе инсерционные нокаут-мутанты *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5* и *Athsp70-14* (табл. 1). Семена мутантов получены из коллекции NASC (Великобритания). Предварительно проведено выделение гомозиготных мутантных линий. Идентификация гомозигот осуществлялась методом ПЦР. Для реакции использовали Т-ДНК-специфичный праймер (LBb1.3, 5'-ATTTTGCCGATTTTCGGAAC-3') и ген-специфичные праймеры (табл. 1), для конструирования которых использовали SALK site iSect tool (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) (данные не представлены).

Для исследования влияния водного дефицита семена дикого типа и мутантов стерилизовали с поверхности 70% этанолом в течение 2 мин, затем в растворе гипохлорита (3% Cl) в течение 10 мин, после чего отмывали стерильной дистиллированной водой 5 раз по 5 мин, и выдерживали в темноте при 4°C в течение 2 суток для синхронизации прорастания. Выращивание проростков и моделирование условий прогрессирующего водного дефицита проводили в условиях стерильной культуры на

Таблица 1. Праймеры для генотипирования мутантов

Ген	Код AGI	ABRC N (NASC N)	Нуклеотидная последовательность, 5'–3'
<i>AtHSP90-1</i>	AT5G52640	SALK_007612 (N507614)	LP: TCAGACCCAACTTCAACATCC RP: TGACCAATGACTGGGAAGATC
<i>AtHSP90-4</i>	AT5G56000	SALK_147967 (N647967)	LP: CTGGAATTTGCATCTTTTTGC RP: GAGTATGGCTGGA CTGCAAAC
<i>AtHSP70-5</i>	AT1G16030	SAIL_839_A08C1 (N867277)	LP: AACATTGATTTGAGGAACCCC RP: AGTCGCTGA GGCTTTCTTAGG
<i>AtHSP70-14</i>	AT1G79930	SALK_082815C (N663129)	LP: AGAGCCA GA GCCAATAACCTC RP: TATCAAATACTTGGGAGCCCC

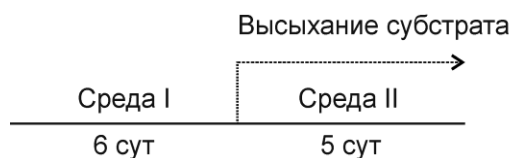


Рис. 1. Схема постановки эксперимента по созданию возрастающего водного дефицита в стерильной культуре на агаризованной среде, как описано (Bobrownnyzky, 2006).

агаризованной среде, как описано (Bobrownnyzky, 2006). Суть метода заключается в том, что 6-суточные проростки после роста на богатой питательной среде I (комплекс минеральных солей МС, 4,5% сахарозы, 1% агара, рН 5,7) переносятся на более бедную среду II (0,25 нормы МС, 1% агара, рН 5,7), толщина которой увеличивается от верхней стороны чашки к нижней для создания градиента высушивания, после чего чашка накрывается водонепроницаемой целлофановой пленкой (рис. 1). Проростки располагались на горизонтальной линии с одинаковым уровнем влажности, по 20 шт. на чашку. Контрольные растения после переноса на новую среду росли при постоянной влажности. Чашки с проростками располагались вертикально и содержались при температуре 22-24°C и 16-часовом фотопериоде при интенсивности света $\sim 100 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. К концу эксперимента возраст проростков составлял 11 суток.

Для анализа генной экспрессии использовали проростки дикого типа. Отбор образцов проводили во время переноса на среду II (0 точка) и далее ежедневно в течение 1-5 суток высыхания субстрата. В контроле образцы отбирали через 1, 3 и 5 суток после переноса. Для сравнения уровня индукции генов использовали проростки, подвергнутые тепловой экспозиции при 37°C в течение 2 ч. Для выделения РНК навеску проростков (80-100 мг) замораживали в жидком азоте и гомогенизировали в фарфоровой ступке. Выделение суммарной РНК проводили с использованием unniPREP

Plant RNA Kit (Analytik Jena) в соответствии с протоколом производителя. Количество и качество выделенной РНК определяли спектрофотометрически. 1 мкг каждого образца использовался для синтеза кДНК с помощью RevertAid First Strand cDNA synthesis Kit (ThermoSci) и праймера oligo(dT)18 в соответствии с инструкцией производителя. ПЦР полученной кДНК проводили с помощью PCR Master Mix (ThermoSci) и ген-специфичных праймеров (табл. 2). *AtUBQ5* использовался в качестве референтного гена. Пары праймеров конструировались с помощью программы IDT PrimerQuest Tool (<https://eu.idtdna.com/pages/tools>). Нуклеотидные последовательности генов брались в банке данных NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Количество транскриптов *AtHSP90-2*, *AtHSP90-3* и *AtHSP90-4* анализировалось суммарно с помощью одной пары праймеров из-за высокой гомологии этих генов. Режим амплификации для HSP: 95°C – 2 мин; 25 циклов: (95°C – 30 с; 52°C – 45 с; 72°C – 90 с); 72°C – 5 мин. Режим амплификации для *AtUBQ5*: 95°C – 3 мин; 25 циклов: (94°C – 60 с; 57°C – 60 с; 72°C – 60 с); 72°C – 5 мин. Визуализация продуктов реакции проводилась путем электрофоретического разделения в агарозном геле, окрашенном бромистым этидием.

В экспериментах по изучению влияния мутаций *hsp* на адаптацию к водному дефициту использовали проростки дикого типа и мутантных линий. После переноса проростков на среду II ежедневно в течение 5 дней измеряли длину корней. При математической обработке результатов подсчитывали средние значения и средние квадратичные отклонения. Тест Левена выявил, что не во всех вариантах дисперсии равны (при $\alpha = 0,05$), поэтому статистический анализ различий между диким типом и мутантами проводили методом непараметрического парного сравнения по Манну-Уитни ($P < 0,05$) с использованием компьютерной программы «Statistica». Все эксперименты повторяли не менее трех раз.

УЧАСТИЕ ЦИТОЗОЛЬНЫХ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА

Таблица 2. Праймеры для анализа генной экспрессии методом ОТ-ПЦР

Ген	Код AGI	Нуклеотидная последовательность, 5'–3'
<i>AtHSP90-1</i>	AT5G52640	F: GTTACCCTATCTACCTTTGGACCG R: CTGCTTGTTGATGAGTCCCA C
<i>AtHSP90-2</i> , <i>AtHSP90-3</i> , <i>AtHSP90-4</i>	AT5G56030 AT5G56010 AT5G56000	F: GCTACCCAATCTCTCTGGATT R: GFACTCCTCCTTGTTGATCTCCTC
<i>AtHSP70-5</i>	AT1G16030	F: TGTCGGA GTTTGGATGAAT R: CTGTCTCAA GTCCAAGGCTA
<i>AtHSP70-14</i>	AT1G79930	F: AGAGCCAGA GCCAATAACCTC R: TATCAAATACTTGGGA GCCCC
<i>AtUBQ5</i>	AT3G62250	F: AACCTTGAGGTTGAATCATCC R: GTCCTTCTTTCTGGTAAACGT

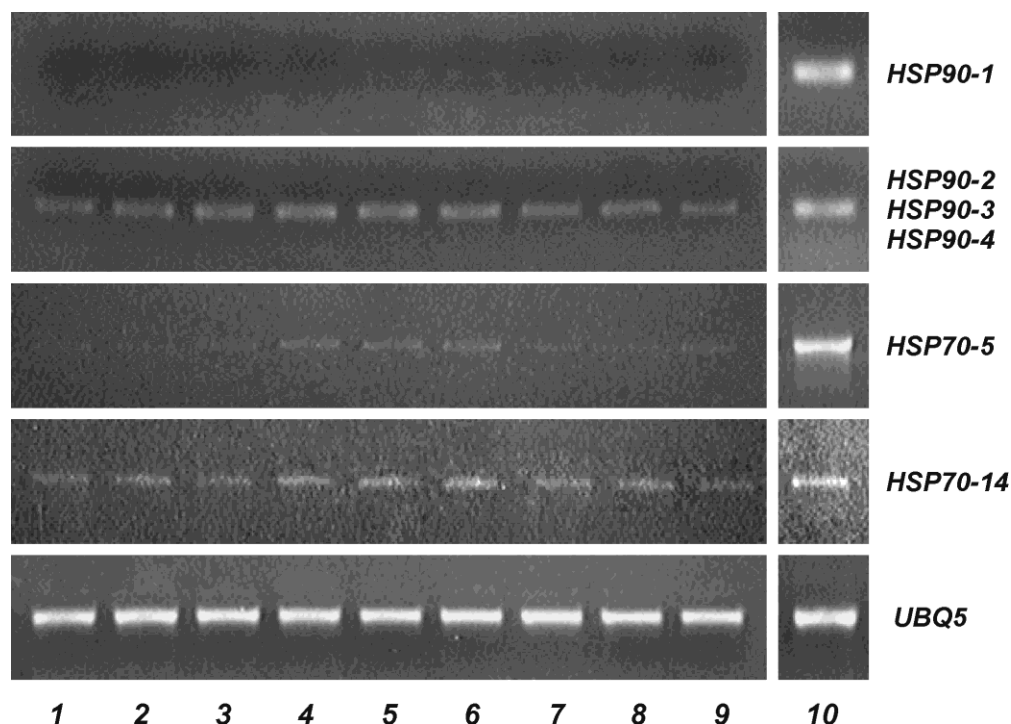


Рис. 2. ОТ-ПЦР анализ экспрессии генов *AtHSP90-1*, *AtHSP90-2* + *AtHSP90-3* + *AtHSP90-4*, *AtHSP70-5* и *AtHSP70-14* в проростках *A. thaliana* (Col): 1–6 – через 0–5 суток после переноса на среду II, при постепенном высыхании среды; 7–9 – через 1, 3 и 5 суток после переноса на среду II, при нормальной влажности; 10 – при тепловом шоке (37°C, 2 ч).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние водного дефицита на экспрессию генов *HSP70* и *HSP90* анализировали у проростков дикого типа методом ОТ-ПЦР. Экспрессия индуцибельных *AtHSP90-1* и *AtHSP70-5* практически не регистрировалась в первые двое суток развития водного дефицита и индуцировалась на низком уровне, начиная с третьих суток (рис. 2). При этом уровень их транскрипции был значительно ниже, чем при тепловом шоке (рис. 2, вариант 10). Начиная с третьих суток, отмечалось также некоторое увеличение количества транскриптов конститутивного *AtHSP70-14*. Высокая степень гомоло-

гии конститутивных *AtHSP90-2*, *AtHSP90-3* и *AtHSP90-4* не позволила подобрать праймеры для индивидуального анализа *AtHSP90-4*, поэтому уровень экспрессии оценивали суммарно для трех генов. Значительное количество их транскриптов регистрировалось при нормальных условиях и возрастало при высыхании среды.

Для функционального анализа целевых генов использовали мутантные линии с нарушенной экспрессией *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5* и *Athsp70-14*. 11-суточные проростки мутантов и дикого типа после пяти суток роста в условиях водного дефицита представлены на рис. 3. В качестве интегральных ростовых по-

КОЗЕКО

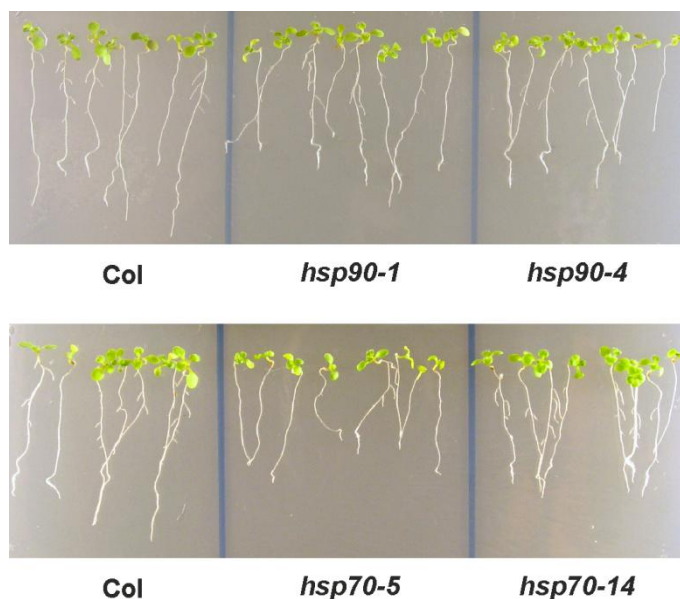


Рис. 3. Проростки *A. thaliana* дикого типа (Col) и нокаут-мутантов *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5* и *Athsp70-14* на пятые сутки роста при водном дефиците.

казателей использовали длину и суточный прирост корня. Показано, что спустя сутки после переноса на среду II рост активировался как в контроле, так и на начальном этапе развития водного дефицита (рис. 4). Однако в дальнейшем снижение влажности среды приводило к угнетению роста проростков, которое становилось особенно сильным, начиная с третьих суток, и заканчивалось практически полной остановкой на 5-е сутки эксперимента (рис. 4, Б, Г).

Математический анализ результатов измерений путем парного сравнения по Манну-Уитни показал, что в контроле мутантные линии *Athsp90-4* и *Athsp70-5* отставали от дикого типа по темпам роста корня, тогда как два других мутанта показывали только тенденцию к их снижению. Однако при водном дефиците уже все мутанты характеризовались достоверно меньшей длиной корня по сравнению с таковой у дикого типа (рис. 4, Б). Снижение их ростовой активности подтверждалось также результатами анализа суточного прироста: у *Athsp90-1* и *Athsp70-5* такое снижение было достоверным на протяжении всего периода развития водного дефицита, у *Athsp90-4* и *Athsp70-14* – на 2-4-е сутки (рис. 4, Г). Следует также отметить, что в контроле торможение роста было достоверным только у *Athsp70-5*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Использованная в работе модель позволяет создавать постепенное развитие водного дефицита в условиях стерильной агаризованной среды (Bobrownzyk, 2006; Бобровницкий, 2016), что приближает его к динамичным флук-

туациям доступности воды в природе. В данной модели постепенное высыхание среды в течение 5 суток (рис. 1) приводило к снижению водного потенциала среды с $-0,034$ МПа до $-0,743$ МПа и, как результат, снижению водного потенциала проростков *A. thaliana* с $-0,12$ МПа до $-0,22$ МПа (Бобровницкий, 2013).

Анализ экспрессии генов HSP в условиях прогрессирующего водного дефицита выявил постепенное усиление транскрипции конститутивных *AtHSP90* и *AtHSP70-14*, а также слабую индукцию *AtHSP90-1* и *AtHSP70-5*. При этом определенный порог активации приходился на третий день высыхания среды. Последовательное включение конститутивного и индуцибельного HSP70 в защиту растительных клеток от засухи выявлялось нами ранее у мальвы (Козеко, Рахметов, 2016). При этом синтез конститутивной изоформы усиливался на протяжении всего периода высыхания субстрата, тогда как индуцибельная изоформа появлялась при сильной засухе, и уровень ее синтеза был ниже, чем конститутивной. В данной работе оценка индукции *AtHSP70-5* и *AtHSP90-1* как «слабой» основана на сравнении с высоким уровнем их индукции при тепловом шоке. Это указывает на дифференциальную регуляцию этих генов при действии различных факторов. Например, ранее сообщалось об экспрессии *AtHSP70-5* в ответ на высокую температуру и отсутствии таковой при низкой температуре, что отличало данный ген от других цитозольных *AtHSP70*, у которых активация экспрессии выявлялась в обоих случаях (Sung et al., 2001). У *Athsp90-1* показана специфичность по отношению к раз-

УЧАСТИЕ ЦИТОЗОЛЬНЫХ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА

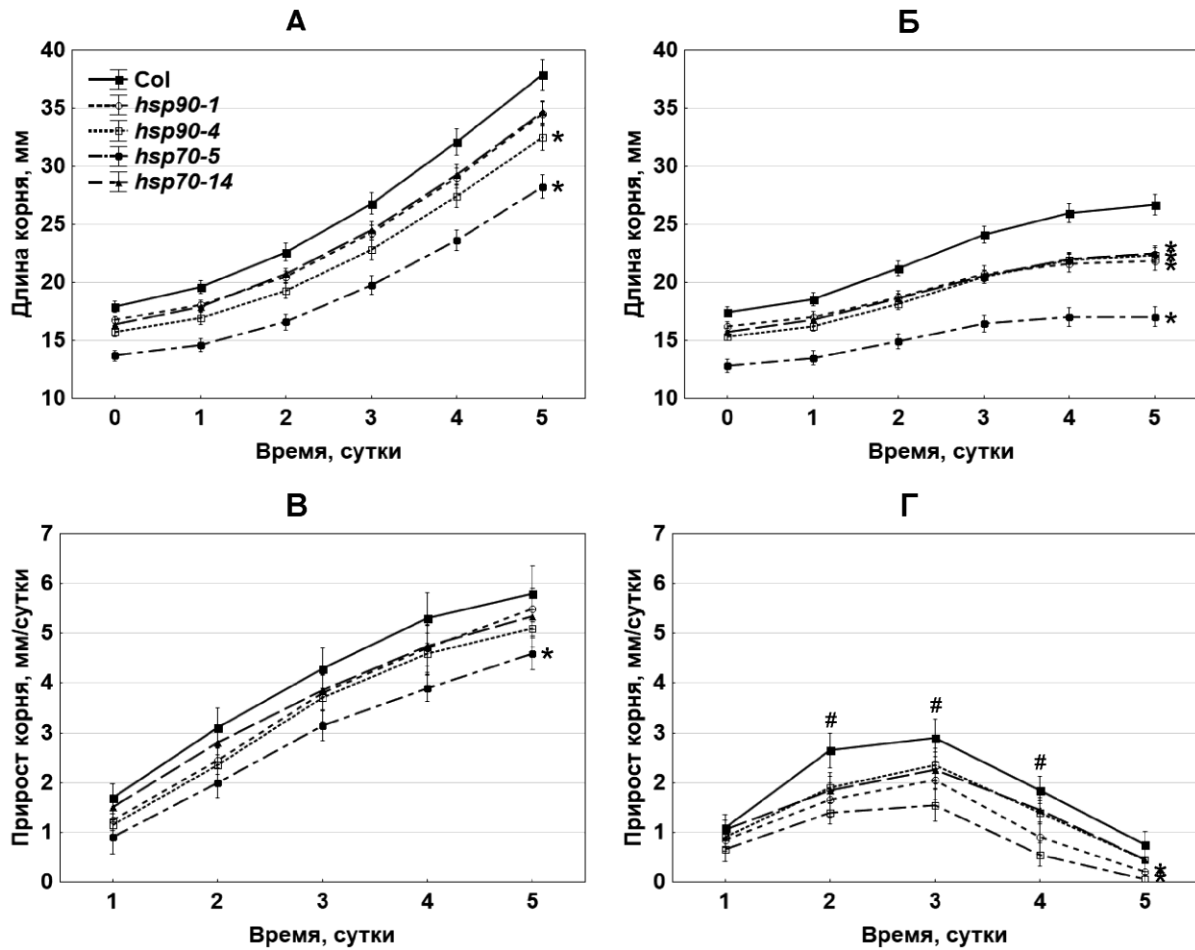


Рис. 4. Динамика роста главного корня проростков *A. thaliana* дикого типа (Col) и нокаут-мутантов *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5* и *Athsp70-14* через 0-5 суток после переноса на среду II в контроле (А, В) и при водном дефиците (Б, Г): А, Б – длина корня; В, Г – суточный прирост корня. Обозначения на графике (А) относятся ко всем графикам. Данные представлены в виде средних значений и их стандартных ошибок. (*) – статистически достоверные отличия отдельной мутантной линии на всех сроках эксперимента по сравнению с диким типом; (#) – статистически достоверные отличия всех мутантных линий от дикого типа на отдельном сроке (тест Манна-Уитни, $P < 0,05$).

личным тяжелым металлам (Milioni, Natzopoulos, 1997; Naralampidis et al., 2002).

Высыхание среды вызвало торможение роста корня проростков *A. thaliana*, которое значительно усиливалось, начиная с 3-х суток, и приводило к остановке роста на 5-е сутки. Такая кинетика роста, в целом, совпадает с данными, полученными для дикого типа с использованием этой модели ранее, и может объясняться снижением активности деления и растяжения клеток корня (Bobrownzyku, 2006; Бобровницкий, 2013). У всех нокаут-мутантов *hsp* угнетение роста в условиях прогрессирующей засухи оказалось более сильным по сравнению таковым у дикого типа. Поскольку более низкие темпы роста мутантов *Athsp70-5* и *Athsp90-4*, либо тенденция к их снижению у *Athsp70-14* и *Athsp90-1* наблюдались также в

контроле, можно предположить, что определенная доля эффекта водного дефицита может объясняться необходимостью соответствующих генов для поддержания ростовой активности в нормальных условиях. Это согласуется с результатами других исследований. Так, некоторая задержка развития наблюдалась у взрослых растений мутантных линий *Athsp90-2* и *Athsp90-3*, дефицитных по конститутивным генам, в то же время у *Athsp90-1* отмечали только тенденцию к отставанию (Sangster et al., 2007). В другой работе, показавшей появление измененных фенотипов у *Athsp90-1*, высказано предположение о необходимости ничтожно малых количеств соответствующего индуцибельного белка для нормального развития растений (Samakovli et al., 2007). Редуцированный рост регистрировали при нарушенной экспрессии

гена *AtHSP70-15*, высоко гомологичного к *AtHSP70-14*. В то же время, растения нокаут-мутанта *Athsp70-14* на стадии розетки имели фенотип дикого типа (Jungkunz et al., 2011). Предполагается, что отсутствие одной из изоформ может компенсироваться за счет других членов семейства.

Следует подчеркнуть, что более чувствительными к засушливым условиям оказались мутанты *Athsp70-5* и *Athsp90-1* по индуцибельным членам. Это выразалось как в более низких темпах роста корня на протяжении развития водного дефицита, так и в более ранней его остановке при сильном обезвоживании. В сочетании с данными анализа генной экспрессии, выявившими слабую индукцию соответствующих генов на трети сутки высыхания среды, такие результаты могут указывать на их включение в защиту белкового гомеостаза при обезвоживании клеток выше определенного уровня. При сравнении с данным (Bobrownnyzky, 2006) можно предполагать, что такого порогового уровня проростки достигают при снижении содержания воды в среде ниже 40%. Это коррелировало с резкой активацией биосинтеза пролина на трети сутки прогрессирующей засухи в условиях данной модели, а также со снижением активности пролиферации меристематических клеток корня и образования корневых волосков (Бобровницкий, 2013; Бобровницкий, 2016).

В целом, полученные данные показывают, что экспрессия как конститутивных *AtHSP70-14* и *AtHSP90-4*, так и индуцибельных *AtHSP70-5* и *AtHSP90-1*, показывающих умеренную активацию при развитии водного дефицита, вносит определенный вклад в защиту клеток и поддержание ростовой активности при засухе. При этом активация их экспрессии происходит при снижении влажности среды до определенного уровня, по-видимому, приводящего к существенному нарушению белкового гомеостаза клеток. Также следует отметить значимость *AtHSP90-4* и особенно *AtHSP70-5* для поддержания ростовой активности проростков в норме.

ЛИТЕРАТУРА

Бобровницкий Ю.А. 2013. Реакція проростків *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. на помірний водний дефіцит на клітинному та молекулярному рівнях: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. Київ : 18 с. (Bobrownnyzky J.A. 2013. Reaction of seedlings of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. on moderate water deficit at the cellular and molecular levels: PhD Thesis. Kyiv : 18 p.)

Бобровницкий Ю. 2016. Образование разветвленных корневых волосков у *Arabidopsis thaliana* при прогрессирующей засухе. Цитология и генетика. 50 (5) : 72-78. (Bobrownnyzky J. 2016. Production of branched root hairs under progressive drought stress in *Arabidopsis thaliana*. Cytol. Genet. (Tsitologiya i Genetika). 50 (5) : 72-78.)

Кордюм Е.Л., Сытник К.М., Бараненко В.В., Белявская Н.А., Климчук Д.А., Недуха Е.М. 2003. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях. Киев : 277 с. (Kordyum E.L., Sytnik K.M., Baranenko V.V., Belyavskaya N.A., Klimchuk D.A., Nedukha E.M. 2003. Cell Mechanisms of Plant Adaptation to Adverse Environmental Factors in Natural Conditions. (Kletochnye mekhanizmy adaptatsii rastenii k neblagopriyatnym vozdeistviyam ekologicheskikh faktorov v yestestvennykh usloviyakh). Kiev : 277 p.)

Козеко Л.С., Рахметов Д.Б. 2016. Особливості динаміки синтезу білків теплового шоку HSP70 у *Malva silvestris* і *M. pulchella* (Malvaceae) у зв'язку зі стійкістю до високої температури, затоплення та посухи. Укр. ботан. журн. 73 (2) : 194-203. (Kozeko L.Ye., Rahmetov D.B. 2016. Variation in heat shock proteins HSP70 synthesis dynamics in *Malva silvestris* and *M. pulchella* (Malvaceae) in connection with tolerance to high temperature, flooding and drought. Ukr. Bot. J. 73 (2) :194-203.)

Billi D., Potts M. 2002. Life and death of dried prokaryotes. Res. Microbiol. 153 : 7-12.

Bobrownnyzky J. 2006. A method for the imitation of drought stress in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Introduction. 1 : 98-105.

Bray E.A. 2002. Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using microarray and differential expression data. Ann. Bot. 89 : 803-811.

Cazalé A.C., Clément M., Chiarenza S., Roncato M.A., Pochon N., Creff A., Marin E., Leonhardt N., Noël L.D. 2009. Altered expression of cytosolic/nuclear HSC70-1 molecular chaperone affects development and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. J. Exp. Bot. 60 : 2653-2664.

Cho E.K., Hong C.B. 2004. Molecular cloning and expression pattern analyses of heat shock protein 70 genes from *Nicotiana tabacum*. J. Plant Biol. 47 : 149-159.

Haralampidis K., Miliony D., Rigas S., Hatzopoulos P. 2002. Combinatorial interaction of cis elements specify the expression of the *Arabidopsis AtHsp90-1* gene. Plant Physiol. 129 : 1138-1149.

Jacob P., Hirt H., Bendahmane A. 2017. The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. Plant Biotechnol. J. 15 : 405-414.

УЧАСТИЕ ЦИТОЗОЛЬНЫХ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА

- Jia D., Zhang B., Zhang P.P., Zhang J.Y., Liu Y.H., Wang J.S., Ma R.Y. 2015. Identification of differentially expressed genes in *Alternanthera philoxeroides* under drought stress using suppression subtractive hybridization. *Russ. J. Plant Physiol.* 62 (1) : 103-110.
- Jungkunz I., Link K., Vogel F., Voll L.M., Sonnewald S., Sonnewald U. 2011. *AtHsp70-15*-deficient *Arabidopsis* plants are characterized by reduced growth, a constitutive cytosolic protein response and enhanced resistance to TuMV. *Plant J.* 66 : 983-995.
- Krishna P., Gloor G. 2001. The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperones.* 6 : 238-246.
- Lin B., Wang J., Liu H., Chen R., Meyer Y., Barakat A., Delseny M. 2001. Genomic analysis of the Hsp70 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperones.* 6 : 201-208.
- Liu Y., Wu J., Sun N., Tu C., Shi X., Cheng H., Liu S., Li S., Wang Y., Zheng Y., Uversky V.N. 2017. Intrinsically disordered proteins as important players during desiccation stress of soybean radicles. *J. Proteome Res.* 16 : 2393-2409.
- Mayer M.P., Bukau B. 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 62 : 670-684.
- Milioni D., Hatzopoulos P. 1997. Genomic organization of hsp90 gene family in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 35 : 955-961.
- Picard D. 2002. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* 59 : 1640-1648.
- Prasinos C., Krampis K., Samakovli D., Hatzopoulos P. 2005. Tight regulation of expression of two *Arabidopsis* cytosolic Hsp90 genes during embryo development. *J. Exp. Bot.* 56 : 633-644.
- Rizhsky L., Liang H., Shuman J., Shulaev V., Davletova S., Mittler R. 2004. When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol.* 134: 1683-1696.
- Samakovli D., Thanou A., Valmas C., Hatzopoulos P. 2007. Hsp90 canalizes developmental perturbation. *J. Exp. Bot.* 58 : 3515-3524.
- Sangster T.A., Bahrami A., Wilczek A., Watanabe E., Schellenberg K., McLellan C., Kelley A., Kong S.W., Queitsch C., Lindquist S. 2007. Phenotypic diversity and altered environmental plasticity in *Arabidopsis thaliana* with reduced Hsp90 levels. *PLoS ONE.* 7 : 1-15.
- Sato Y., Yokoya S. 2008. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, sHSP17.7. *Plant Cell Rep.* 27 : 329-334.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.* 58 : 221-227.
- Sung D.Y., Guy C.L. 2003. Physiological and molecular assessment of altered expression of *Hsc70-1* in *Arabidopsis*. Evidence for pleiotropic consequences. *Plant Physiol.* 132 : 979-987.
- Sung D.Y., Vierling E., Guy C.L. 2001. Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis* Hsp70 gene family. *Plant Physiol.* 126 : 789-800.
- Wang X.Q., Yang P.F., Liu Z., Liu W.Z., Hu Y., Chen H., Kuang T.Y., Pei Z.M., Shen H.S., He Y.K. 2009. Exploring the mechanism of *Physcomitrella patens* desiccation tolerance through a proteomic strategy. *Plant Physiol.* 149 : 1739-1750.
- Yamada K., Fukao Y., Hayashi M., Fukazawa M., Suzuki I., Nishimura M. 2007. Cytosolic HSP90 regulates the heat shock response that is responsible for heat acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 282 : 37794-37804.
- Ye T., Shi H., Wang Y., Chan Z. 2015. Contrasting changes caused by drought and submergence stresses in bermudagrass (*Cynodon dactylon*). *Front. Plant Sci.* 6 : 951.
- Zou J., Liu A., Chen X., Zhou X., Gao G., Wang W., Zhang X. 2009. Expression analysis of nine rice heat shock protein genes under abiotic stresses and ABA treatment. *J. Plant Physiol.* 166 : 851-861.

Поступила в редакцию
18.03.2018 г.

INVOLVEMENT OF CYTOSOLIC HEAT SHOCK PROTEINS HSP70 AND HSP90 IN ADAPTATION OF ARABIDOPSIS THALIANA SEEDLINGS TO WATER DEFICIT

L. Ye. Kozeko

*Kholodny Institute of Botany
of National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)
E-mail: liudmyla.kozeko@gmail.com*

Arabidopsis thaliana contains 9 genes encoding cytosolic heat shock proteins HSP70 and 4 genes of cytosolic HSP90. In order to characterize roles of some constitutive and inducible members of these families in adaptation to drought, their function was investigated in seedlings under progressive water deficit. Imitation of drought was done by gradually decreasing water content in the growth medium in sterile conditions. RT-PCR analysis of gene expression showed a moderate activation of constitutive *AtHSP70-14* and *AtHSP90* (3 genes in total) during dehydration of the medium, as well as a weak induction of *AtHSP70-5* and *AtHSP90-1* when water deficit was reached a certain level. In addition, growth activity in loss-of-function mutants with reduced expression of *AtHSP90-1*, *AtHSP90-4*, *AtHSP70-5* and *AtHSP70-14* was estimated. It was determined that retardation of root growth under water deficit was more significant in mutant seedlings when compare to wild type. As a whole, the growth kinetics correlated with the gene expression pattern. Noteworthy, deficiency of *AtHSP90-4* and especially *AtHSP70-5* led to a decrease in root growth also under normal conditions. The obtained results indicate that these HSPs are activated to moderate levels in response to dehydration and involved in maintaining the growth activity.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, drought, HSP70, HSP90, gene expression, mutants

**УЧАСТЬ ЦИТОЗОЛЬНИХ БІЛКІВ ТЕПЛОВОГО ШОКУ
HSP70 І HSP90 В АДАПТАЦІЇ ПРОРОСТКІВ ARABIDOPSIS THALIANA
ДО ВОДНОГО ДЕФІЦИТУ**

Л. Є. Козеко

*Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного
Національної академії наук України
(Київ, Україна)
E-mail: liudmyla.kozeko@gmail.com*

Arabidopsis thaliana містить 9 генів, що кодують цитозольні білки теплового шоку HSP70, і 4 гени цитозольних HSP90. Дана робота присвячена вивченню функціонування окремих конститутивних та індукбельних представників цих родин в адаптації проростків до посухи. Для імітації посухи використовували модель прогресуючого водного дефіциту в ростовому середовищі за стерильних умов. Аналіз генної експресії методом ЗТ-ПЦР показав помірну активацію конститутивних *AtHSP70-14* і *AtHSP90* протягом поступового зневоднення середовища, а також індукцію *AtHSP70-5* і *AtHSP90-1* при досягненні певного рівня водного дефіциту. Крім того, порівняння ростової активності в проростків дикого типу і нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5* і *Athsp70-14* показало, що порушення експресії відповідних HSP призводить до посилення пригнічення росту кореня за нестачі води. В цілому, ростова кінетика корелювала зі змінами в генній експресії. Слід також відзначити повільніший ріст кореня у мутантних проростків *Athsp90-4* і особливо *Athsp70-5* за нормальних умов. Отримані результати показують, що дані гени HSP помірно активуються за впливу водного дефіциту та відіграють певну роль у підтриманні ростової активності.

Ключові слова: *Arabidopsis thaliana*, посуха, HSP70, HSP90, експресія генів, мутанти